

(12)特許協力条約に基づいて公開された国

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局

Rec'd PCT/PTO 20 APR 2004

(43)国際公開日  
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/038017 A1(51)国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 1/15, 9/26 // (C12N 1/15, C12R 1:66) (C12N 9/26, C12R 1:66)

(SUZUKI,Kanako) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社岐阜研究所内 Gifu (JP). 塚越 規弘 (TSUKAGOSHI,Norihiro) [JP/JP]; 〒466-0825 愛知県名古屋市昭和区八事本町101-2 中京大学内放送大学愛知学習センター Aichi (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/013353

(22)国際出願日: 2003年10月20日 (20.10.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(74)代理人: 小西 富雅, 外 (KONISHI,Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エステートビル7階 Aichi (JP).

(26)国際公開の言語: 日本語

(81)指定国(国内): CN, US.

(30)優先権データ:  
特願 2002-307922

2002年10月23日 (23.10.2002) JP

(84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒460-0003 愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 Aichi (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72)発明者; および

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 鈴木 哉子



(54) Title: ISOMALTOSE SYNTHASE-KNOCKOUT MICROORGANISM BELONGING EUMYCOTA

A1

(54)発明の名称: イソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した、真菌類に属する微生物

(57) Abstract: It is intended to provide a host microorganism whereby the expression of a gene encoding a target protein can be effectively elevated in the case of transferring the gene. It is also intended to provide a transformant whereby a target protein can be produced at a high efficiency. It is further intended to provide a production process whereby a target protein can be produced at a high productivity. A microorganism which belongs to *Eumycota* and lacks the major isomaltose synthase. A gene encoding a target protein is transferred into the microorganism to give a transformant. Then the transformant is cultured under conditions allowing the expression of the transferred gene to thereby produce the protein.

WO 2004/038017 A1

(57)要約: 目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入した際に当該遺伝子の発現を効率的に高めることが可能な宿主微生物を提供する。また、目的のタンパク質を高い効率で生産可能な形質転換体を提供する。更には、目的のタンパク質を高い生産性で生産可能な生産方法を提供する。真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物である。当該微生物に目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る。導入された遺伝子が発現可能な条件下で当該形質転換体を培養してタンパク質を産生させる。

## 明細書

## イソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した、真菌類に属する微生物

## 5 技術分野

本発明はタンパク質の生産に利用される微生物に関する。詳しくは、タンパク質生産用微生物を作製するための宿主として用いることができる微生物、タンパク質生産用微生物、及び該微生物を用いたタンパク質の生産方法に関する。

## 10 背景技術

糸状菌は菌体外に各種の酵素蛋白質を分泌生産することが知られている。糸状菌の持つこうした特性を利用して古来より味噌、醤油、清酒製造などの醸造分野や酵素製剤の製造に *Aspergillus* 属糸状菌を始めとする各種の糸状菌が広く用いられてきた。菌体外酵素の生産能力を高めるために長期間にわたる育種が行われた結果、培養液 1 リットルあたり数十グラムの酵素蛋白質を生産できる菌株も得られている。

一方、近年の遺伝子組換え技術の応用により多様な蛋白質の生産が可能となつた。遺伝子組換え菌による酵素蛋白質の生産においては目的の酵素を大量に生産させるための手段として、遺伝子の転写能力を高める事が高生産に繋がるとの考え方から、より強い転写能力を持つプロモーターを検索し、これを利用することが行われている。このような観点から、これまでに種々の糸状菌由来のプロモーターが単離され、それらを用いたタンパク質の生産系が報告されている。例えば、アスペルギルス・オリゼのアミラーゼ遺伝子のプロモーター（例えば特開昭 62-272988 号公報及び *Biotechnology*, 5, 368 (1987) を参照）、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター（例えば *Biotechnology*, 6, 1419 (1

988)を参照) 等が単離され、利用に供されている。さらに、エンハンサーの導入や調節領域の改変などによりプロモーターの能力を高める事も行われてきた。以上のようなプロモーターの能力に依存した遺伝子産物の生産によって、旧来の育種法による能力増強に比べると効率的に生産能力を上げる事が出来ている。しか  
5 しながら、絶対生産量として菌体外酵素蛋白質の生産量を上げるためには更に旧来の育種法を適用しての宿主菌株の育種改良が行われていた。

#### 発明の開示

本発明は以上の背景に鑑み、目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入した  
10 際に当該遺伝子の発現を効率的に高めることが可能な宿主微生物を提供することを目的とする。また、目的のタンパク質を高い効率で產生可能な形質転換体を提供することを目的とする。更には、目的のタンパク質を高い生産性で生産することが可能な生産方法を提供することをも目的とする。

本発明者らは以上の課題を解決すべく麹菌タカアミラーゼ A に注目して種々の  
15 検討を行った。麹菌タカアミラーゼ A はデンプンやマルトースで誘導され、グルコースで抑制される典型的な誘導酵素である。麹菌タカアミラーゼ A 遺伝子の誘導機構は詳細に解析されており、AmyR により転写誘導が制御され、真の転写誘導物質はイソマルトースである事が明らかにされている。デンプンやマルトースにより麹菌タカアミラーゼ A 遺伝子が転写誘導されるのは、デンプンやマルトース  
20 に  $\alpha$ -グルコシダーゼが作用することによりイソマルトースが生成することに起因することが明らかにされている。

本発明者らはまず、麹菌タカアミラーゼ A 遺伝子の誘導機構を解明する過程で、  
アスペルギルス・ニドランスにおける主たるイソマルトース生成酵素である  $\alpha$ -  
25 グルコシダーゼ B に着目し、これを欠損する変異株( $\Delta agdB$  株)を作製した。続い

て当該欠失変異株にタカアミラーゼ A 遺伝子を導入した。このようにして得られた形質転換体において、イソマルトース源となるデンプン及びマルトースを用いてタカアミラーゼ A 遺伝子の誘導効果を調べたところ、コントロール（野生株を宿主としてタカアミラーゼ A 遺伝子を導入した形質転換体）に比較して飛躍的に

5 タカアミラーゼ A が発現していることが判明した。この結果から、イソマルトースによる発現誘導を受ける遺伝子のコードするタンパク質を生産する目的において、主たるイソマルトース生成酵素遺伝子を欠損した微生物を宿主として用いることが極めて有効な手段となるとの知見が得られた。本発明はかかる知見に基づき完成されたものであって次の各構成を提供する。

10 [1] 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物。

[2] 糸状菌に分類される微生物である、[1]に記載の微生物。

[3]  $\alpha$ -グルコシダーゼ B 遺伝子が欠損したアスペルギルス・ニドランス。

[4] 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物に、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

15 [5] 前記微生物が糸状菌に分類される微生物である、[4]に記載の形質転換体。

[6]  $\alpha$ -グルコシダーゼ B 遺伝子を欠損したアスペルギルス・ニドランスに、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

20 [7] 前記外来遺伝子が次の改変プロモーターを含有する、[4]～[6]のいずれかに記載の形質転換体、

糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN (第1塩基配列：配列番号1) を含む第1DNA断片と、CGGNNNNNNNN GG (第2塩基配列：配列番号2) を含む第2DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

25 [8] 前記外来遺伝子が発現可能な条件下で[4]～[7]のいずれかの形質転換体

を培養するステップ、及び  
產生されたタンパク質を回収するステップ、  
を含む、タンパク質の生産方法。

## 5 図面の簡単な説明

図 1 はタカアミラーゼ A 遺伝子（アスペルギルス・オリゼ）のプロモーター領域の配列を示す図である。

図 2 はタカアミラーゼ A 遺伝子（アスペルギルス・オリゼ）のプロモーター領域の模式図であり、転写制御因子結合配列（CCAAT 配列・SRE）の位置と、変異導入箇所を示す。部位特異的変異によって導入した制限酵素サイトを下線で示す。CCAAT は CCAAT 配列（広域転写活性化因子（HAP 複合体）の結合因子）、SRE はデンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子（AmyR）の結合因子、TATA は TATA-box、+1 は転写開始点をそれぞれ表す。

図 3 は実施例 3 におけるアミラーゼ遺伝子発現ベクターの作製過程を示す図である。

図 4 は実施例 4 におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。表中の N.D. は Not Determined (未決定) を表す。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の構成を詳細に説明する。本発明の第 1 の局面は、真菌類に属し主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した微生物を提供する。当該微生物は特定のタンパク質を生産する際に利用される形質転換体を作製する場合の宿主として用いられ得る。本発明における「真菌類に属する微生物」は特に限定されない。例えば、アスペルギルス・オリゼやアスペルギルス・ニドランス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、ペニシリウム・クリソゲノ

ム、ニューロスボラ・クラッサ、トリコデルマ・レッセイなどの糸状菌（ツボカビ門、接合菌門、子囊菌門、サビキン類、不完全菌類を含む）が含まれる。尚、本発明における糸状菌とは広義の糸状菌を意味し、酵母（子囊菌類、端子菌類、不完全菌類）を包含する。

5

本発明における「主たるイソマルトース生成酵素」とは当該微生物においてイソマルトースの生成に最も関与している酵素のことをいう。即ち、対象の微生物がイソマルトース生成活性を有する異なる種類の酵素を有する場合には、これら複数の酵素の中で最も活性の高いものがここでの主たるイソマルトース生成酵素に該当する。本発明における微生物は少なくともこのような酵素をコードする遺伝子が欠損しておればよく、例えばイソマルトースの生成に関与するその他の酵素（二つ以上ある場合には複数であってもよい）の遺伝子があわせて欠損していてよい。イソマルトース生成酵素の具体例としては $\alpha$ -グルコシダーゼ A、 $\alpha$ -グルコシダーゼ B、トランスクルコシダーゼ、グルクアミラーゼ、イソプルラナーゼを挙げることができる。

自然界に存在する微生物又は保存機関などから入手される微生物から適切なものを選択し、これに主たるイソマルトース生成酵素をコードする遺伝子が欠損するように変異処理を施すことによって本発明における微生物を作製することができる。変異処理の方法としては例えば、欠損させようとする遺伝子に相当する配列に予め変異を加えたものを含むベクターを用意し、これを宿主微生物の染色体に遺伝子工学的手法を用いて組込み、これによって宿主微生物染色体上に存在する目的の遺伝子を破壊する方法や、部位特異的変異法などを用いることができる。

25 本発明の第二の局面は上記微生物を宿主として外来遺伝子を導入することによ

り得られる形質転換体に関し、具体的には、真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した微生物に、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体を提供する。かかる本発明の形質転換体はタンパク質の生産に利用することができる。

5

本発明の形質転換体を作製する際に用いられる形質転換方法は特に限定されず、公知の形質転換方法から適当なものを選択できる。例えばプロトプラスト化した菌体を用いた Turner らの方法 (Gene, 36, 321-331(1985)) を利用することができる。その他、五味らの方法 (Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987)) などを採用してもよい。

形質転換をベクターを用いて行う場合において、使用されるベクターの種類は特に限定されない。例えば、宿主との関係において形質転換に適した市販のベクターを用意し、これに目的の遺伝子を挿入したものを用いることができる。

15 ベクターには、宿主微生物を形質転換した際に形質転換体を選択するのに好適な選択マーカーが組込まれていることが好ましい。選択マーカーは使用する宿主との関係で適当なものが採用される。オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子 (argB)、硝酸還元酵素遺伝子 (niaD)、アセトアミダーゼ遺伝子 (amds)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpC)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (DHFR) 等の栄養要求性相補遺伝子、オリゴマイシン、デストマイシン、ハイグロマイシン等に対する薬剤耐性遺伝子などを選択マーカーの具体例として挙げることができる。

25 本発明において使用される外来遺伝子は、原則的にはプロモーターと構造遺伝子（コード領域）とを含む。但し、形質転換に供される宿主微生物のプロモータ

ーを利用できる場合（予め外的に適当なプロモーターが宿主微生物に導入されている場合も含む）には、本発明の外遺伝子としてプロモーター領域を含まないもの、即ちコード領域のみを含むものやコード領域及びターミネータ領域のみを含むものなどを用いてもよい。

5 プロモーターとしてはイソマルトースで誘導されるという性質を有するものが用いられ、一方、構造遺伝子としては形質転換体に組込まれた後に当該プロモーターの支配下となるものが用いられる。このような条件を満たす限りプロモーター及び構造遺伝子は特に限定されず、プロモーターとしては例えばアスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属等の微生物におけるタンパク質をコードする遺伝子の中でイソマルトースによる誘導が行われるプロモーターを用いることができる。より具体的には、アスペルギルス属の $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ等をコードする遺伝子のプロモーターを用いることができる。中でも、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターを用いることが好ましい。これらのプロモーターはそれを有する微生物より制限酵素処理、PCR法などの遺伝子工学的手法を用いて取得することができる。また、目的とするプロモーターが組込まれたベクターを利用して利用できる場合には当該ベクターから制限酵素処理やPCR法などによって取得することができる。一方、構造遺伝子としては例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ等の糖質関連酵素をコードする遺伝子や、キモシン等のプロテアーゼをコードする遺伝子、或はリバーゼをコードする遺伝子などを用いることができる。尚、同種タンパク質をコードする遺伝子であっても異種タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。ここでの同種タンパク質とは、宿主微生物が本来的に産生するタンパク質を意味する。一方、異種タンパク質とは、宿主微生物が本来は産生しないタンパク質、即ち外的にそれをコードする遺伝子が導入されることにより初めて産生されるタンパク質を意味する。

形質転換の際にプロモーターと構造遺伝子（コード領域）とが同一のベクターから供与される必要はない。即ち、導入用プロモーターを保有する第1のベクターと、導入用構造遺伝子を保有する第2のベクターとを用意し、これら両者を用いて形質転換を行うことにより目的の外来遺伝子が導入された形質転換体を得る  
5 こととしてもよい。

自然界に存在するプロモーターを改変して得られる改変プロモーターを用いることもできる。以下に改変プロモーターの具体例を示す。尚、以下の説明においてプロモーター活性を高めることができる機能を「エンハンサー機能」という。

10 (1) 糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN (第1塩基配列：配列番号1) を含む第1DNA断片と、CGGNNNNNNNNN GG (第2塩基配列：配列番号2) を含む第2DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

(2) 前記第1塩基配列が CCAATTAGAAG (配列番号3) である、(1)に記載の改変プロモーター。

15 (3) 前記第2塩基配列が CGGHNWWWWNWHGG (配列番号4) である、(1)又は(2)に記載の改変プロモーター。

(4) 前記第2塩基配列が CGGWWWWWWWWWHGG (配列番号5) である、(1)又は(2)に記載の改変プロモーター。

20 (5) 前記第2塩基配列が CGGAAATTTAAAGG (配列番号6)、CGGAATTTAACGG (配列番号7) 又は CGGAAATTTAACGG (配列番号8) である、(1)又は(2)に記載の改変プロモーター。

(6) 前記プロモーターの 5'末端側から 3'末端側に向かって順に第1DNA断片、第2DNA断片が並ぶよう挿入される、(1)～(5)のいずれかに記載の改変プロモーター。

25 (7) 前記プロモーターに存在する CCAAT 配列よりも 5'側上流域、又はプロモー

ター領域に存在する SRE 領域よりも 3' 側下流域に前記第 1 DNA 断片及び前記第 2 DNA 断片が挿入される、(6)に記載の改変プロモーター。

(8)複数個の前記第 1 DNA 断片及び複数個の前記第 2 DNA 断片が挿入される、(1)～(7)のいずれかに記載の改変プロモーター。

5 (9)前記第 1 DNA 断片と前記第 2 DNA 断片が同じ数ずつ挿入される、(8)に記載の改変プロモーター。

(10)一つの第 1 DNA 断片と一つの第 2 DNA 断片とが組みをなし、かつ各組において第 1 DNA 断片が前記プロモーターの 5' 末端側に位置するように、前記プロモーターに前記第 1 DNA 断片と前記第 2 DNA 断片が挿入される、(9)に記載の改変プロモーター。

10 (11)糸状菌で機能するプロモーターに、配列番号 9 の塩基配列を有する DNA 断片、又は該 DNA 断片の一部が改変された DNA 断片であってエンハンサー機能を有する DNA 断片を 1 ～数個組込んでなる改変プロモーター。

(12)前記糸状菌で機能するプロモーターがアスペルギルス・オリゼのタカアミ

15 ラーゼのプロモーターである、(1)～(11)のいずれかに記載の改変プロモーター。

尚、以上において N は A、T、C、G のいずれかであることを表す。

以上の改変プロモーターにおける第 1 DNA 断片及び第 2 DNA 断片は、例えば市販の DNA 合成機を用いて合成することができる。また、例えばアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼ A 遺伝子のプロモーター領域を鋳型とし、適当なプライマーを用いた PCR 法によって調製することもできる。

第 1 DNA 断片及び第 2 DNA 断片を含む一つの DNA 断片を調製し、これを糸状菌で機能するプロモーターへ組込むことにより改変プロモーターを作製することもできる。例えば、アスペルギルス属などにおけるプロモーターの中から第 1 DNA 断片及び第 2 DNA 断片に相当する配列を内包するプロモーターを選択し、これを鋳

25

型とした PCR 法などを行うことによって、このような DNA 断片を調製することができる。鑄型として用いることができる好適なプロモーターの例としてはアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼ A 遺伝子のプロモーター（配列番号 12）を挙げることができる。プロモーターの改変に用いられる DNA 断片の塩基配列の一例を配列番号 9 に示す。この DNA 断片（CCAAT-SRE 断片）はアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼ A 遺伝子におけるプロモーター領域の一部（240 位～367 位（転写開始点を +1 として -312 位～-185 位））である。尚、この DNA 断片に一部の改変を施した DNA 断片であっても、それが組込まれるプロモーターの活性を高める機能（エンハンサー機能）を有する限りプロモーター領域の改変に利用できる。ここで、一部の改変とは DNA 断片を構成する一部の塩基が置換、欠失される場合、又は 1～数個の塩基が付加若しくは挿入される場合をいう。このような改変が許容される程度は、改変が行われる DNA 断片上の部位によって異なる。エンハンサー機能に重要な部分は第 1 DNA 断片及び第 2 DNA 断片に相当する配列部分であるので、当該配列部分の改変の程度は小さいことが好ましい。他方、その他の部分はエンハンサー機能に直接関与しないと予想されることから比較的大きな改変が許容されると考えられる。例えば、1～20 個程度、好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個の塩基の置換、欠失、付加などを行うことができる。尚、このような改変には 5' 末端、3' 末端、又はその他の部位への制限酵素切断配列の導入や、シグナルペプチドをコードする配列の付加などが含まれる。

以上の改変プロモーターでは糸状菌で機能するプロモーターに第 1 DNA 断片及び第 2 DNA 断片（以下、これらの DNA 断片及びこれらを含む DNA 断片をまとめて、「エンハンサー機能を有する DNA 断片」とも呼称する）が挿入されて改変プロモーターが構築されるが、これらの DNA 断片の挿入部位は特に限定されない。但し、改変が施されるプロモーターとして CCAAT 配列及び SRE を有するものを採用する

場合にはこれら二つの配列の間以外の部位に挿入することが好ましい。即ち、CCAAT配列よりも5'末端側の部位又はSREよりも3'末端側の部位にエンハンサー機能を有するDNA断片を挿入することが好ましい。

- 5 糸状菌で機能するプロモーターに複数個の第1DNA断片及び複数個の第2DNA断片を挿入して改変プロモーターを作製することもできる。この場合、使用する第1DNA断片と第2DNA断片の個数を同じとすることが好ましい。また、一つの第1DNA断片と一つの第2DNA断片とが組をなし、かつ各組において第1DNA断片が5'末端側に位置するようにプロモーターに挿入されることが好ましい。
- 10 第1DNA断片と第2DNA断片を含むDNA断片を用いる場合においても、これを複数挿入してプロモーターの改変を行ってもよい。この場合においても、改変が施されるプロモーターとしてCCAAT配列及びSREを有するものを採用するときには、これら二つの配列の間以外の部位に当該DNA断片を挿入することが好ましい。
- 15 複数のエンハンサー機能を有するDNA断片を組込んでプロモーターの改変を行うことにより更なるプロモーター活性の向上が期待できる。

改変プロモーターの作製に供される、糸状菌で機能するプロモーターとしては糸状菌で機能するという性質を有する限りその種類は特に限定されない。例えば、  
20 アスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属等の微生物におけるタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターを挙げることができる。具体的には、アスペルギルス属の $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ等をコードする遺伝子のプロモーターを用いることができる。中でも、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターを用いることが好ましい。これらの  
25 プロモーターはそれを有する微生物より、制限酵素処理、PCR法などの遺伝子工

学的手法を用いて取得することができる。また、目的のプロモーターが組込まれたベクターを利用できる場合には、当該ベクターから制限酵素処理や PCR 法などによって取得することができる。

5 本発明の形質転換体を、導入された外来遺伝子を発現可能な条件下で培養することにより目的のタンパク質を産生させることができる。培養用の培地は使用される形質転換体に応じて適切なものが用いられる。例えば市販の各種培地又はこれらにアルギニン、ウリジン等の形質転換体の生育、選択、タンパク質の発現促進などに必要な成分を添加した培地などを用いることができる。

10

所望時間培養した後の培養液又は菌体より目的のタンパク質が回収される。分泌型タンパク質であれば培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液からの回収する場合には例えば、培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。他方菌体内から回収する場合には例えば、菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後に上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

25 【実施例 1】  $\alpha$ -グルコシダーゼ B (agdB) の精製と agdB 遺伝子のクローン化

(1-1)  $\alpha$ -グルコシダーゼ B の精製と酵素学的性質

*Aspergillus nidulans* ABPU1 (*pyrG89, bIA1, wA3, argB2, pyroA4*: Mol. Gen. Genet. (1997) 253:520-528, Motoyama, T., M. Fujisawa, N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta and M. Takagi.)を、炭素源として2%スターチを含む最小培地 2L 5 に胞子数  $10^6$ /ml となるように接種し、37°Cで24時間振とう培養した。吸引ろ過により菌体を分離し、液体窒素で凍結後、液体窒素存在下で菌体を粉末状に破碎した。菌体湿重量 1gあたり 5ml の抽出バッファー (0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 2mM PMSF を含む 0.2M MES-KOH バッファー, pH 5.5) を加えて懸濁させ、ポリトロンでホモゲナイズした。16,000 x g, 4°Cで30分間遠心分離し、得られた上 10 清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液より  $\alpha$ -グルコシダーゼ B を以下のようにして精製した。

細胞抽出液を 1mM EDTA, 0.5mM PMSF を含む 20 mM MES-KOH バッファー (pH 5.5) に対して透析した後、あらかじめ 20 mM MES-KOH バッファー (pH 5.5) で平衡 15 化した DEAE-Tyopearl 650M カラム (2.5 x 10 cm) に供した。本カラムに吸着したタンパク質を 200 ml の 0-0.5 M NaCl 直線濃度勾配により溶出した。0.1 M NaCl で溶出された主要な  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性画分を回収し、1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM MES-KOH バッファー (pH 5.5) に対して透析した。この活性画分を同バッファーで平衡化した Phenyl Sepharose CL-4B カラム (1 x 12 cm) に吸 20 着させ、40 ml の 1.5-0 M 硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により溶出した。硫酸アンモニウム 0 M で溶出された活性画分を回収し、20 mM HEPES-KOH バッファー (pH 7.4) に対して透析した後、Centriprep YM-10 で 1 ml に濃縮した。この濃縮サンプルをあらかじめ同バッファーで平衡化した Resource Q カラムに供した。Resource Q カラムクロマトグラフィーは AKTA explorer 10S システムを使用して 25 行った。本カラムに吸着したタンパク質は 60 ml の 0-1 M NaCl 直線濃度勾配に

より溶出した。塩濃度 0.3 M で溶出された活性画分を 20 mM HEPES-KOH バッファー (pH 7.4) に対して透析し、精製酵素とした。

本精製酵素は 74 kDa と 54 kDa のサブユニットで構成され、至適 pH は 5.5、pH 5 安定性は pH 5.0 から pH 8.5 の間、また温度安定性は 45°C までは酵素活性を 90% 以上保持しており、pH 4.0 以下、pH 11.0 以上、60°C 以上で完全に酵素活性が失われた。

本酵素は分解活性に加えて位置選択的に  $\alpha$  - 1, 6 グルコシド結合を形成する糖転移活性を有している。マルトオリゴ糖に対して高い加水分解活性を示し、マルトオリオースに対して最も高い反応性を示し、マルトテトラオース、マルトペニタオースの順に反応性が低下することから、重合度の高いマルトオリゴ糖に反応性が低いことが示唆された。また、本酵素はイソマルトース、ニゲロース、コージビオース、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースに対しても加水分解活性を示した。しかし、 $\beta$ -ニトロフェニルグルコシドおよびショ糖、スターチに対してほとんど活性を示さなかった。また、本酵素の糖転移活性により、マルトースからグルコースと複数の糖転移産物が合成された。その主要な糖転移産物はイソマルトースとパノースであった。反応開始から 6 時間で、基質として加えたマルトースの約 50 % に相当する量の糖転移産物が生成し、そのうちの 60 % がイソマルトースであった。また、コージビオース、ニゲロースを基質にした場合はイソマルトースが生成し、イソマルトースを基質にした場合はイソマルトリオースが生成した。

#### (1 - 2) $\alpha$ -グルコシダーゼ B 遺伝子のクローン化

上記精製酵素標品を SDS-PAGE に供し、74 kDa 及び 55 kDa の各サブユニットを分離し、電気泳動的に *Sequi-Blot* PVDF 膜に転写した。74 kDa 及び 55 kDa の各サブユニットに相当するバンドを膜より切り出し、Applied Biosystems model 4

73A プロテインシークエンサーにより N 末端アミノ酸配列を決定した。74 kDa 及び 55 kDa の各サブユニットの N 末端アミノ酸配列はそれぞれ SQAGVDPLDRPGNDYVK D 及び QSHRQLGAGRWRSAVRH であった。また、74 kDa 及び 55 kDa の各サブユニットの内部アミノ酸配列を決定するために、精製酵素を SDS-PAGE に供し、両サブユニットを分離し、それぞれをアクリルアミドから電気溶出した。各サブユニットをリジルエンドペプチダーゼで分解し、得られたペプチドを 15% SDS-PAGE により分画し、電気泳動的に PVDF 膜へ転写した。それぞれの主要なバンドについてプロテインシークエンサーにより N 末端アミノ酸配列を決定した。74 kDa サブユニットに由来する主要ペプチド (30 kDa) 及び 55 kDa サブユニットに由来する主要ペプチド (15 kDa) の N 末端アミノ酸配列はそれぞれ THLPQNPFLYGLGE 及び DVSHWLGDN ISDWLWSYRLSI であった。

74 kDa サブユニットの N 末端および内部アミノ酸配列に基づいて、N 末端のプライマー N1 (5' -ARGCNGGNGTIGAYCCIYTNGA-3')、N2 (5' -YTNGAYMGICCNGGIAAYGA-3') および内部アミノ酸配列に相当するプライマー I1 (5' -CCRTANARRTGIGGRTTYT GNGG-3')、I2 (5' -TGIGGRTTYTGNGGIARRTGNGT-3') を設計し、PCR 反応に供した。*A. nidulans* 染色体 DNA を鋳型にプライマー N1, I1 を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応物の一部とプライマー N2, I2 を用いて再度 PCR 反応を行い、*agdB* 遺伝子の一部 (440bp) の DNA 断片を増幅した。*A. nidulans* 染色体 DNA を *Hind* III で消化し、*Hind* III 消化 DNA 断片をアガロース電気泳動で大きさにより分画した。上述した 440bpDNA 断片とハイブリダイズする 5-7 kb の DNA 断片を pBluescript II KS+ (STRATAGENE 社) に連結し、大腸菌 JM109 (STRATAGENE 社) を形質転換した。次に、440bpDNA 断片とハイブリダイズする形質転換株を取得した。本形質転換株は *agdB* 遺伝子を含む 5.6 kb の *Hind* III DNA 断片を保持していた。このプラスミドを pGBH6 と命名した。クローン化した DNA 断片の塩基配列は LI-COR model 4000

DNA sequencer を使用して Sanger らの方法で決定した。*agdB* 遺伝子は 57–72 bp の 3 つの短いイントロンを含む 3,055 bp からなり、995 アミノ酸残基をコードしている。本遺伝子の塩基配列(配列番号 27)は DDBJ/EMBL/GenBank に登録した。その accession number は AB057788 である。化学的に決定した 74 kDa 及び 55 k 5 Da の各サブユニットの N 末端アミノ酸配列は、推定アミノ酸配列の 21 から 39 番目、515 から 531 番目までのアミノ酸配列と一致し、また、両サブユニットの内部アミノ酸配列もそれぞれ 167 から 187 番目、637 から 656 番目までのアミノ酸配列と一致していた。この結果は  $\alpha$ -グルコシダーゼ B が 1 本のポリペプチド前駆体として合成され、プロセシングを受けてヘテロ二量体構造をとることを示している。N 末端から 20 番目までのアミノ酸配列はシグナルペプチドの典型的な特徴を有しており、本酵素は分泌性酵素であることを示唆している。

#### 【実施例 2】 改変プロモーターの作製

##### (2-1) プロモーター領域のサブクローニング

15 アスペルギルス・オリゼ JCM02239 株のタカアミラーゼ A 遺伝子 (*taaG2*) 3164 bp [Gene, 84, 319–327 (1989)] を含む pTG-taa [Mol. Gene. Genet., 254, 119–126 (19 97)] を出発材料としてタカアミラーゼ A 遺伝子プロモーター領域およびタカアミラーゼ A 遺伝子のコーディング領域を調製した。

まず、pTG-taa からタカアミラーゼ A (*taaG2*) プロモーター領域を含む 750 bp の *Ec 20* *oRI-SaII* 断片を取得し、この断片をプラスミド pKF18K (東洋紡績株式会社) のマルチクローニングサイトの *EcoRI-SaII* 部位に挿入してタカアミラーゼプロモーターを含むプラスミド pKF-taaP を取得した。プロモーター領域への変異導入操作および改変プロモーター領域の構築はこのプラスミドを用いて行った。

25 (2-2) 転写制御因子結合配列を含む DNA 断片の取得

既に報告されている広域転写活性化因子(HAP)の結合因子であるCCAAT配列〔Mol. Gen. Genet., 237, 251-260(1993)〕およびデンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子(AmyR)の結合因子SRE〔Mol. Gen. Genet., 262, 668-676(1999)〕を含む断片を次の様に取得した。

5 まず、CCAAT配列の5'末端側にXbaI部位を、3'末端側にNotI部位を付加した合成DNAとしてXNF ( 5'-CCGCTCGAGGCACCATCCAATTAGAAGCGCGGCCGCTAACTAT-3' : 配列番号13) と、この配列の相補鎖としてXNR ( 5'-ATAGTTAGCGGCCGCGCTTCTAATTGGA  
10 TGGTGCCTCGAGCGG-3' : 配列番号14) を合成し、続いてこれら合成DNAの相補鎖同士を混合して98°C 10分間加熱後、2時間かけて30°Cまで冷却し、その後4°Cまで冷却してアニーリングさせることによってCCAAT配列を単独で含むDNA断片を取得した。

一方、SREの5'末端側と3'末端側にSphI部位およびHincII部位を付加した合成DNAとしてSREf ( 5'-GACTAGTTAACCTAGGGCGGAAATTAAACGGATGTTAACTAGTC-3' : 配列番号15) と、この配列の相補鎖としてSREr ( 5'-GACTAGTTAACATCCCGTTAAATTCCGCCCCCTAGGTAACTAGTC-3' : 配列番号16) を合成し、上記と同様の方法でSREを単独で含むDNA断片を取得した。以後、ここで作製したCCAAT配列のみを含むDNA断片を「CCAAT断片」、SREのみを含むDNA断片を「SRE断片」とそれぞれ呼ぶことにする。

20

次に、CCAAT配列からSREまでの領域を含むDNA断片(配列番号9。以下、「CCAAT-SRE断片」という)を、以下のプライマーおよび鑄型として(2-1)で調製したpKF-taaPを用いて、94°C 30秒、54°C 30秒、72°C 1分30秒を1サイクルとして30サイクルのPCR反応を行うことによって取得した。尚、PstIサイトを含む断片(配列番号10。以下、「CCAAT-SRE(PstI)断片」という)とXbaI-NotIサイトを含む断

片（配列番号 1 1。以下、「CCAAT-SRE(*Xba*I-*Not*I)断片」という）の 2 種類を作製した。

*Pst*I サイトを付加した上流プライマー、

5. *CSPf*: 5'-AAACTGCAGACCACCTCTAGGCATCGGACG-3'（配列番号 1 7）

*Pst*I サイトを付加した下流プライマー、

*CSPr*: 5'-TTTCTGCAGTGTGATTTGTGGTTGAGTGG-3'（配列番号 1 8）

*Xba*I サイトを付加した上流プライマー、

*CSXf*: 5'-CGGCTCGAGGCATCGGACGCACCATCC-3'（配列番号 1 9）

10 *Not*I サイトを付加した下流プライマー、

*CSNr*: 5'-ATAGTTAGCGGCCGCCGACTGTGATTTGTGGTTGAGTGG-3'（配列番号 2 0）

#### （2-3）改変プロモーターを含むプラスミドの構築

タカアミラーゼA遺伝子プロモーター領域への変異導入を次のように行った。ま

15 ず、（2-1）で調製したpKF-taaPへプロモーター領域改変用の制限酵素サイトを導入するために、以下に示すプライマーおよびMutan-Super Express Km Kit (TAKARA社) を用いてpKF-taaPに対する部位特異的変異導入を行った。なお、野生型プロモーターの配列（配列番号 1 2）を図 1 に示し、導入した制限酵素サイトの位置を図 2 に示した。

20

下流域（配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 465）への*Not*I サイト導入用のプライマー、

*Not*-b: 5'-CGCTTGGATTCCCCGCCGGCCGCAGAGCTTAAAGTATGTCCC-3'（配列番号 2 1）

25 下流域（配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 440）への*Xba*

*Xba*I サイト導入用のプライマー、

*Xba*-b: 5'-GAATGCAATTAAACTCTTCCTCGAGTCGCTTGGATTCCCCGCC-3' (配列番号 2  
2)

5 上流域(配列番号 12 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 153)への *Xba*I サイト導入用のプライマー、

*Xba*-a: 5'-GTAGTAAAACCCGGAGTCAGCGGCCGCCAAGCCCCAAGTCCTCACG-3' (配列番号  
23)

10 上流域(配列番号 12 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 128)への *Xba*I  
*Xba*-a サイト導入用のプライマー、

*Xba*-a: 5'-CGTCAAGGGATGCAAGACTCGAGTAGTAAAACCCGGAGTC-3' (配列番号 24)

CCAAT 配列と SRE に挟まれた領域(配列番号 12 に示すタカアミラーゼプロモー  
ターの存在位置 252)への *Not*I サイト導入用のプライマー、

15 *Not*: 5'-GCACCATCCAATTAGAAGCGCGGCCGAAACAGCCCCAAGAAAAAGG-3' (配列番号 2  
5)

下流域(配列番号 12 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置 490)への *S*  
*pe*I サイト導入用のプライマー、

*STATA*: 5'-TAAAGTATGTCACTAGTCGATGCGAT-3' (配列番号 26)

20

次に、(2-2) で調製した CCAAT 断片を *Xba*I および *Not*I で切断し、アガロ  
ースゲル電気泳動に供して回収・精製した。得られた DNA 断片を上記のようにして  
プロモーター下流域に導入した *Xba*-*Not*I 部位に挿入し、改変プロモーター PCCA  
ATb を含むプラスミド pKF-CCAATb を作製した。同様に (2-2) で調製した SRE  
25 断片を *Hinc*II で切断して得られる DNA 断片がプロモーター下流域の *Xba*-*Not*I

部位に挿入された改変プロモーター-PSREb を含むプラスミド pKF-SREb、(2-2) で調製した CCAAT-SRE(*Pst*I)断片を *Pst*I で切断して得られる DNA 断片がプロモーター下流域の *Pst*I 部位に挿入された改変プロモーター-PCSP を含むプラスミド pKF-PCSP、(2-2) で調製した CCAAT-SRE(*Xba*I-*Not*I)断片を *Xba*I、*Not*I で切断し 5 て得られる DNA 断片がプロモーター下流域の *Xba*I-*Not*I 部位に挿入された改変プロモーター-PCSPb を含むプラスミド pKF-PCSPb をそれぞれ作製した。また、CCAAT-SRE(*Xba*I-*Not*I)断片を *Xba*I、*Not*I で切断し、回収・精製した断片をプロモーター下流域の *Xba*I-*Not*I 部位に挿入し、その後、CCAAT-SRE(*Pst*I)断片を *Pst*I 部位に挿入することにより、2箇所に CCAAT-SRE 断片が挿入された改変プロモーター-PC 10 SPb を含むプラスミド pKF-PCSPb を作製した。

### [実施例 3]アミラーゼ遺伝子発現ベクターの構築

アミラーゼ遺伝子発現ベクターの作製過程を図 3 に示す。まず、プラスミド pUC18 (東洋紡績株式会社) を *Sal*I で消化後、Klenow処理によって平滑末端化し、セルフライゲーションすることによって *Sal*I 部位の欠失したプラスミド pUC18(S-) 15 を取得した。一方、プラスミド pTG-taa よりタカアミラーゼA遺伝子の *Eco*RI断片を単離し、この断片を pUC18(S-) のマルチクローニングサイトの *Eco*RI 部位に挿入して pUC-taa(S-) を取得した。このプラスミド pUC-taa(S-) を *Eco*RI で部分分解し、*taaG2*遺伝子の 3'末端側の *Eco*RI サイトが欠失したプラスミド pUC-taa を取得した。 20 同様にして、pBluescriptII KS(+) の *Xba*I、*Sal*I、*Bam*HI を欠失させたプラスミド pBlue(XSE-) を取得した。

次に、pUC-taa から *taaG2*を含む *Eco*RI-*Hind*III断片を単離して、この断片をプラスミド pBlue(XSE-) のマルチクローニングサイトの *Eco*RI-*Hind*III 部位に挿入して、 25 *taaG2*を含むプラスミド pBlue-taa を取得した。

続いて、(2-3)で得られた改変プロモーターを含むプラスミド pKF-taaPM シリーズ (pKF-CCAATb、pKF-SREb、pKF-PCSP、pKF-PCSb、または pKF-PCSPb) から改変プロモーター領域の *EcoRI-SaII* 断片を単離して、プラスミド pBlue-taa のマルチクローニングサイトの *EcoRI-SaII* に挿入し、改変プロモーター領域と *taaG2* 遺伝子が連結したプラスミド pBlue-taaM を取得した。pBlue-taaM から改変プロモーターを含んだ *taaG2* 遺伝子の *XbaI-BamHI* 断片を単離し、プラスミド pBAR7 (pBluescriptII KS(+)) にアスペルギルス・ニドランス由来の C 末が欠失した *argB* 遺伝子が挿入されたプラスミド) のマルチクローニングサイトの *XbaI-BamHI* に組み込み、プロモーター活性測定用プラスミド pBAR-taaM シリーズ (pBAR-CC 10 AATb、pBAR-SREb、pBAR-PCSP、pBAR-PCSb、及び pBAR-PCSPb) とした。尚、野生型プロモーターを有するプラスミドを同様の手順で作製し、これを pBAR-taa とした。

#### 【実施例 4】 $\alpha$ -グルコシダーゼ B 欠損株を宿主とした形質転換体の取得

15 (4-1)  $\alpha$ -グルコシダーゼ B (agdB) 遺伝子破壊株の構築

(1-2) で得られたプラスミド pGBH6 に含まれる *agdB* 遺伝子の一部 (4.9 kb) の *SacI* 断片 (-3,132 から +1,689) を pBluescriptII KS(+) にサブクローン化して pGBS5 を構築した。pGBH6 の *ClaI-HindIII* 4.9 kb 断片 (+222 から +4,726) と pGBS5 から調製した *Apal-ClaI* 3.1 kb 断片 (-2,834 から +221) を *Apal*、*ClaI* 消化した pBluescript II KS+ に連結して pGBA8 を構築した。*agdB* 遺伝子破壊用プラスミド pGB $\Delta$ P2 は、pGBA8 の *SaII* 1 断片 (*agdB* 遺伝子の -181 から +3,435 に相当) を *N. crassa* *pyr4* 遺伝子を含む *BspI* 2.0 kb 断片と置換して構築した。なお、*BspI* 2.0 kb 断片は *pyr4* 遺伝子を含む pTG1 (Mol. Gen. Genet. (1997) 254:119-126, M. Kato, A. Aoyama, F. Naruse, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi) より調製した。25 次に pGB $\Delta$ P2 から破壊された *agdB* 遺伝子を含む 5.9 kb *KpnI-SpeI* 断片を調製し、

*A. nidulans* ABPU1 を形質転換して  $\Delta agdB$  株 DBP9 を得た。 $agdB$  部位に *pyr4* 遺伝子が挿入されていることはサザンプロット解析により確認した。尚、この菌株は以下のとおり寄託されている。

受託番号： F E R M P-19070

5 国際寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番3号 中央第6

寄託日：2002年（平成14年）10月18日

#### （4-2）形質転換

10 糸状菌の形質転換を次のように行った。まず、実施例3で得られたpBAR-taa、pBAR-PCSB、pBAR-PCSPbの各プラスミドをEcoRVで消化後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の操作を行い、精製したプラスミドを形質転換に用いた。形質転換は次のように行った。（4-1）で得られたアスペルギルス・ニドランスの $\alpha$ -グルコシダーゼ欠損株DBP9 (*(pyrG89) bIA1 wA3 argB2 pyroA4*  $\Delta agdB::pyr4$ ) と、コントロール株としてアスペルギルス・ニドランス ABPU1株 (*bIA1 pyrG89 wA3 argB2 pyroA4*) をコンプリート培地（2% マルトエキス、2% グルコース、0.1% バクトペプトン）に必要な栄養源（アルギニン、ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン）を添加した培地で、37°C、一晩振とう培養した後、得られた菌体を細胞壁溶解液 [20 mg/ml Yatalase (宝酒造社)、0.8 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0)] に懸濁し、30°Cで1~2時間緩やかに振とうすることによりプロトプラスト化した。得られたプロトプラストをナイロンフィルターで濾過することにより、残存する菌体を除去した。次にこのプロトプラスト及び上記精製した各プラスミドを用いて、Turnerらの方法 [Gene, 36, 321-331(1985)] により形質転換を行い、アルギニンを含まない培地（ツアベック・ドックス培地 (0.2% NaNO<sub>3</sub>、0.1% K<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、2% グルコ-

ス (pH5.5) にウリジン、ピリドキシン、及びビオチンを添加した培地) で生育可能な形質転換体をそれぞれのプラスミドにつき、20から40株ずつ取得した。

(4-3) サザンプロット解析による形質転換体の選択

5 各形質転換株から染色体DNAを次のように調製した。まず、形質転換株をコンプリート培地に必要な栄養源 (ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン) を添加した培地で37°C、一晩振とう培養後、得られた菌体をブフナー漏斗とNo. 2のろ紙 (アドバンテック社) で集めて滅菌水で洗浄した。余分な水分を除去したあと、-80°Cで凍結し、FREEZONE (LABCONCO社) を用いて乾燥させた。乾燥後、1mmのガラス玉を加えて、マルチビーズショッカー (安井器械社) を用いて2000rpm、5分間破碎して微粉末状にし、この菌体破碎物に抽出溶液 [1% ヘキサデシルメチルアンモニウムプロマイド、0.7M NaCl、50mM Tris-HCl、10mM EDTA、1%  $\beta$ -メルカプトエタノール] を加えて攪拌後、室温で30分間放置した。得られた溶菌液をフェノール/クロロホルム抽出して、夾雜するタンパク質を除去後、等量のイソプロパノールを加えて、DNAを沈殿させた。この沈殿物を0.1mg/mlのRNaseを含むTE溶液に溶解して、37°C、30分間反応させた後、さらに0.2mg/mlのproteinaseKを含むTE溶液を加え、37°C、30分間反応させた。この溶液をフェノール/クロロホルム抽出した後、2.5倍容の冷エタノールで沈殿させた。この沈殿物を70% エタノールでリンスして乾燥後、TE溶液に溶解したものを染色体DNA溶液とした。

10

15

20

25 サザンプロット解析は、染色体DNAを *Pvu*IIあるいは*Eco*RVで消化後、アガロースゲル電気泳動で分離してナイロンメンブレン (ロシュ社) にプロットした後、*ta*<sub>a</sub>*G2*の約1000bpの*Bgl*II-*Sma*I消化物をプローブとして検出した。このとき、プローブのラベリングおよびシグナルの検出はDIG核酸検出キット (ロシュ社) を用いて行った。

サザンプロット解析の結果より、宿主として用いた菌株のアミラーゼ生産能の比較に適した形質転換体、即ちプラスミドが $argB$ 座位へ相同的に1コピー組み込まれた株で、染色体に組み込まれるときの位置による影響と、導入される遺伝子の5 コピー数の影響を受けずにアミラーゼ生産能を比較できる形質転換体を、使用したプラスミドにつき、任意に2株以上選択した。

#### [実施例 5] アミラーゼ活性の比較

実施例 4 で得られた、pBAR-taa、pBAR-PCSB、及びpBAR-PCSPbがそれぞれ組み込まれた各形質転換体を用いて、 $\alpha$ -グルコシダーゼB欠損株を宿主とした場合とA BPU1株を宿主とした場合のアミラーゼ生産性を以下の手順で比較した。

まず、各形質転換体を最少培地 (0.9%  $NaNO_3$ 、0.05%  $KCl$ 、0.15%  $KH_2PO_4$ 、0.15% Trace element、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1% グルコース (pH6.5)) に必要な栄養源 (ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン) を添加した寒天培地に放射状に植菌し、37°C、3日間培養した後、この寒天培地から分生胞子を胞子懸濁用溶液 (0.01% tween80、0.8%  $NaCl$ ) に懸濁して綿で濾過し、胞子懸濁液を調製した。この胞子懸濁液から、分生胞子  $1 \times 10^8$  個をSP培地 (1% Starch、1% polypeptone、0.5%  $KH_2PO_4$ 、0.1%  $NaNO_3$ 、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (pH6.5)) またはMP培地 (1% M altose、1% polypeptone、0.5%  $KH_2PO_4$ 、0.1%  $NaNO_3$ 、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (pH 20 6.5)) にアルギニン以外の必要な栄養源 (ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン) を添加した培地100mlに接種し、37°C、36時間振とう培養後、ブフナー漏斗とろ紙で菌体と上清を分離して、上清を酵素溶液とした。

アミラーゼ活性は20mM 酢酸ナトリウムbuffer、10mM  $CaCl_2$ 、2% Soluble Starch (ナカライトスク社)に酵素溶液を加えて150  $\mu$ lの反応系を調製し、これを3

7°Cで20分間反応させて生成した還元糖量をNelson-Somogyi法により定量した。また、1分間に1  $\mu\text{mol}$  のグルコースを遊離する酵素量を1unitとした。次に、測定したアミラーゼ活性値からアミラーゼ生産量を求めて、 $\alpha$ -グルコシダーゼB欠損株を宿主とした場合と、ABPU1株を宿主とした場合のアミラーゼ生産性を比較した。

5

アミラーゼ活性測定の結果を図4に示す。 $\Delta\text{agdB}$ 株を宿主とした $taaG2$ 遺伝子の形質転換体を、デンプンをC源とする培地で培養したときのアミラーゼ生産量は、ABPU1株を宿主としたときの約6倍の生産量であった。これは、 $\alpha$ -グルコシダーゼBが欠損していることにより、誘導物質であるイソマルトースの分解が抑えられ、誘導効果が持続することに因ると考えられる。この結果から、 $\alpha$ -グルコシダーゼBの欠損が、アミラーゼ生産能の増強に非常に有効であることが確認できた。

次に、マルトースをC源とするMP培地で培養した時のアミラーゼ活性を測定した。 $\Delta\text{agdB}$ 株を宿主とした $taaG2$ 遺伝子の形質転換体を用いた場合のアミラーゼ生産量は、ABPU1株を宿主としたときの約7倍であり、 $\Delta\text{agdB}$ 株を宿主として改変プロモーター( $\text{PCSB}$ 又は $\text{PCSPB}$ )を組み込んだ株のアミラーゼ生産量は、ABPU1株を宿主としたときの約2倍の生産量であった。この結果から、イソマルトースを合成しやすいマルトースなどのC源を培地に利用した場合には、 $\text{agdB}$ 遺伝子を欠損した宿主を用いることにより、アミラーゼ生産能を一層増強できることが分った。また改変プロモーターを用いることによりさらに高い生産性が得られることが明らかとなった。尚、図4の表に示されるように、本実施例の系においては最高で1 g/Lのアミラーゼの生産が認められた。

本出願は文部科学省の科学技術振興調整費による委託業務として実施した平成

25 14年度「カビの酵素高生産能を利用した環境調和型工業プロセス技術の基盤研究」

の成果である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、遺伝子を外来的に導入した際に当該遺伝子の発現を効率的に高めることが可能な宿主微生物が提供される。目的タンパク質をコードする遺伝子を当該宿主微生物に導入して得られる形質転換体を用いれば、目的タンパク質を高い生産性で生産することができる。

## 請求の範囲

1. 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物。

5 2. 糸状菌に分類される微生物である、請求の範囲第1項に記載の微生物。

3.  $\alpha$ -グルコシダーゼ B 遺伝子が欠損したアスペルギルス・ニドランス。

4. 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物  
10 に、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換  
体。

5. 前記微生物が糸状菌に分類される微生物である、請求の範囲第4項に記載の  
形質転換体。

15

6.  $\alpha$ -グルコシダーゼ B 遺伝子を欠損したアスペルギルス・ニドランスに、イ  
ソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

7. 前記外来遺伝子が次の改変プロモーターを含有する、請求の範囲第4項に記  
20 載の形質転換体、

糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN (第1塩基配列：配列番号1) を含む第1DNA断片と、CGGNNNNNNNNN GG (第2塩基配列：配列番号2) を含む第2DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

25 8. 前記外来遺伝子が発現可能な条件下で請求の範囲第4項の形質転換体を培養

するステップ、及び  
產生されたタンパク質を回収するステップ、  
を含む、タンパク質の生産方法。

Fig.1

1 GAATTCATGG TGTTTGATC ATTTAAATT TTTATATGGC GGGTGGTGGG CAACTCGCTT 60  
60 CCGGGCAACT CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACGTAAAAT CGTCAAGGGA 120  
121 TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAGT CAACAGCATC CAAGCCCAAG TCCTTCACGG 180  
181 AGAAACCCCA GCGTCCACAT CACGAGCGAA GGACCCACCTC TAGGCATCGG ACGCACCATC 240  
241 CAATTAGAAG CAGCAAAGCG AAACAGCCCA AGAAAAAGGT CGGCCCGTCG GCCTTTCTG 300  
301 CAACGCTGAT CACGGGCAGC GATCCAACCA ACACCCCTCCA GAGTGACTAG GGGCGGAAAT 360  
361 TTAAAGGGAT TAATTTCAC TCAACCACAA ATCACAGTCG TCCCCGGTAT TGTCCCTGCAG 420  
421 AATGCAATT AAACCTTTCT GCGAATCGCT TGGATTCCCC GCCCTGGCC GTAGAGCTTA 480  
481 AAGTATGTCC CTTGTCGATG CGATGTATCA CAACATATAA ATACTAGCAA GGGATGCCAT 540  
541 GCTTGGAGGA TAGCAACCGA CAACATCACA TCAAGCTCTC CCTTCTCTGA ACAATAAAC 600  
601 CCACAGAAGG CATT 615

Fig.2

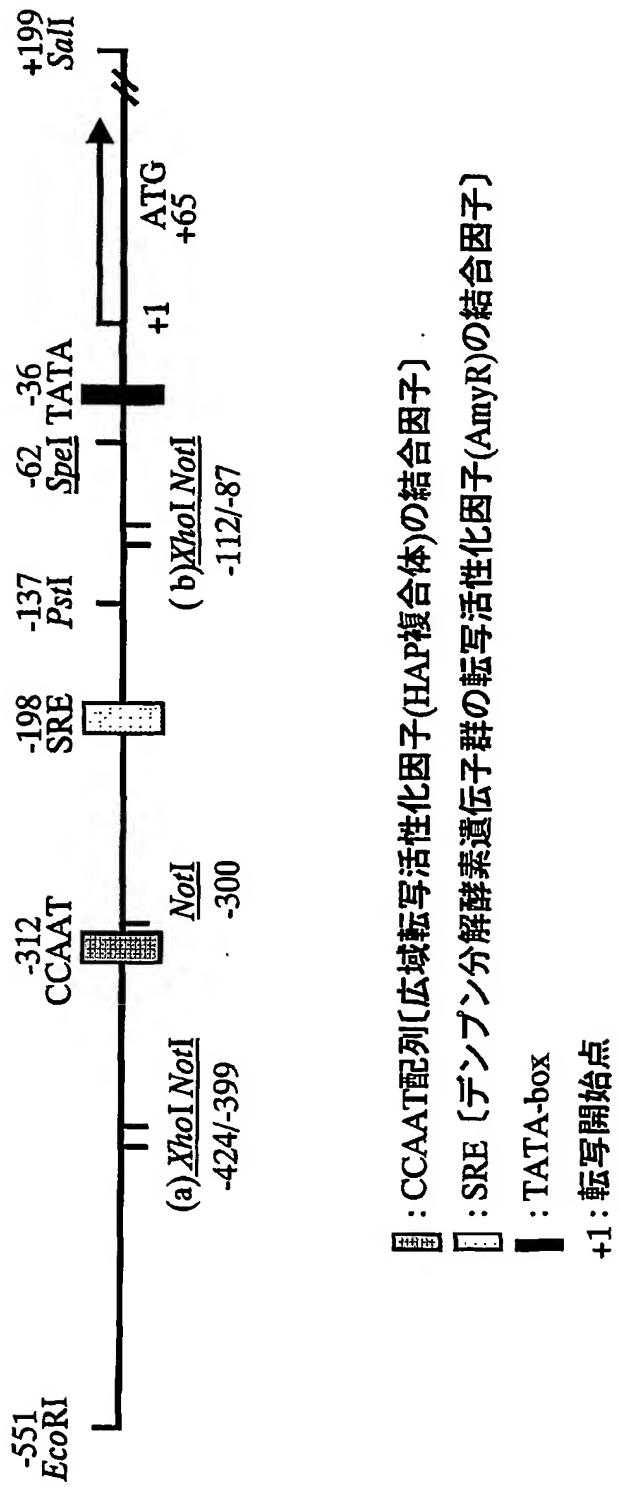
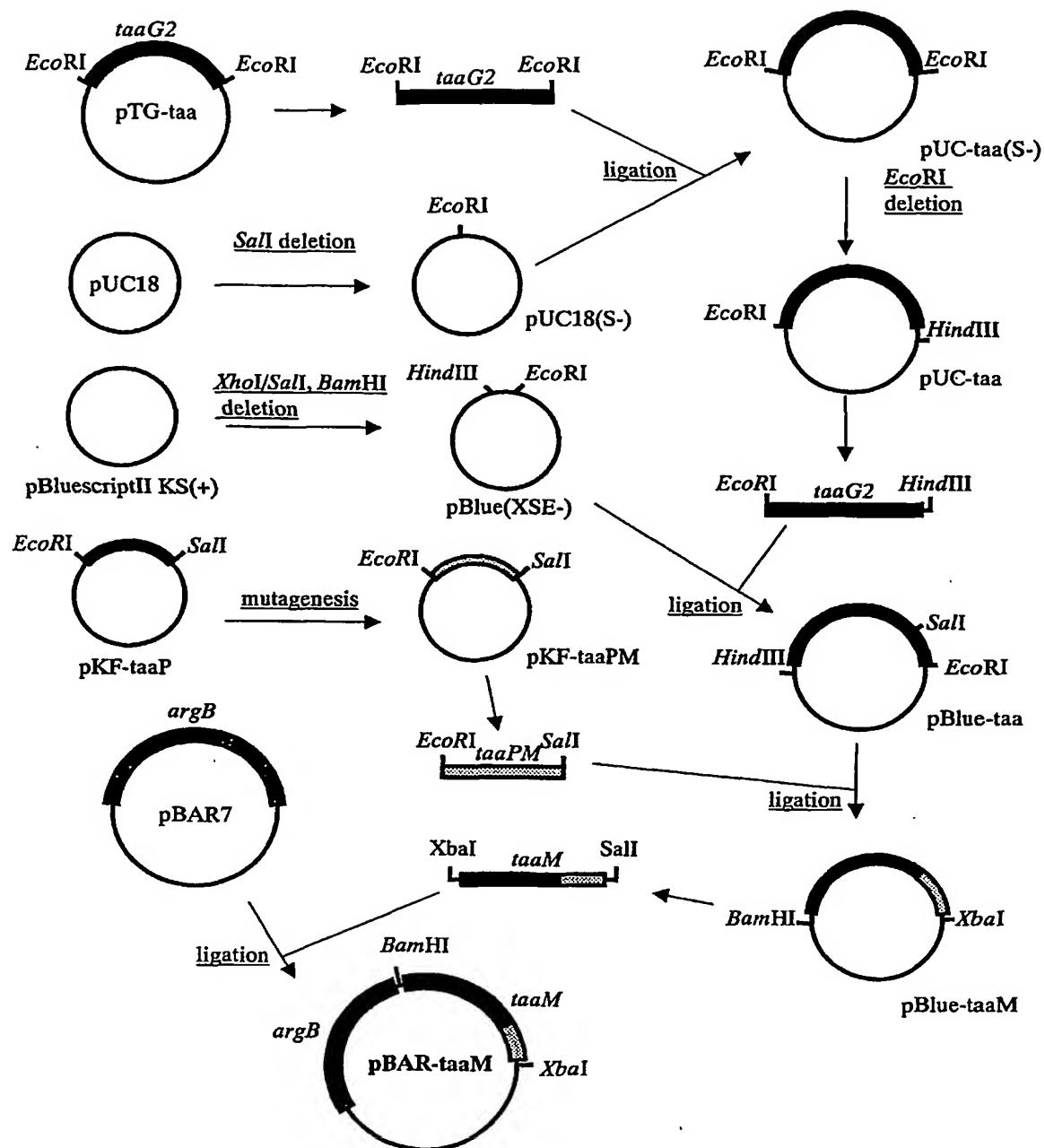


Fig.3



taaG2 : タカアミラーゼA遺伝子

argB : オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(選択マーカー)

taaM : 改変プロモーターを含んだタカアミラーゼ遺伝子

Fig.4

プロモーター	アミラーゼ生産量 (mg/L)					
	デンプン			マルトース		
	ABPU1	Δ agdB	ABPU1/Δ agdB	ABPU1	Δ agdB	ABPU1/Δ agdB
Taa	68	397	5.8	81	572	7.1
PCSb	325	332	1.0	363	727	2.0
PCSPb	478	N.D.	—	462	1031	2.2

## SEQUENCE LISTING

<110> AMANO ENZYME INC.  
SUZUKI, Kanako  
TSUKAGOSHI, Norihiro

<120> Microorganism in which an isomaltose-producing enzyme is deleted

<130> P0205201

<150> JP P2002-307922  
<151> 2002-10-23

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(11)

<223> n stands for any base

<400> 1

ccaa!nnnnn n

11

<210> 2  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<220>

<221> misc\_feature  
<222> (4)..(12)  
<223> n stands for any base

<400> 2  
cggnnnnnnn nngg

14

<210> 3  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<400> 3  
ccaatttagaa g

11

<210> 4  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> n stands for any base

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(10)  
<223> n stands for any base

<400> 4  
cgghnwwwn whgg

14

<210> 5  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<400> 5  
cgwwwwwwww whgg 14

<210> 6  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<400> 6  
cggaaattta aagg 14

<210> 7  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<400> 7  
cggaaatttaa acgg 14

<210> 8  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer sequence

<400> 8  
cgaaaaatttta acgg 14

<210> 9  
<211> 128  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment including CCAAT sequence and SRE

<400> 9  
ccaaatttagaa gcagcaaagc gaaacagccc aagaaaaagg tcggcccgic ggccttttct 60  
gcaacgctga tcacggcag cgatccaacc aacaccctcc agatgtacta ggggcggaaa 120  
tttaaagg 128

<210> 10  
<211> 196  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment including CCAAT sequence and SRE

<400> 10  
ctgcagacca cctcttaggca tcggacgcac catccaatttta gaagcagcaa agcgaaacag 60  
cccaagaaaa aggtcggccc gtccggcttt tcgtcaacgc tgatcacggg cagcgatcca 120  
accaacaccc tccagagtgta cttagggcgg aaatttaaag ggatataattt ccactcaacc 180  
acaaatcaca ctgcag 196

<210> 11  
<211> 193  
<212> DNA



gcttggagg tagcaaccga caacatcaca tcaagcttc ctttttctga acaataaacc 600  
ccacagaagg cattt 615

<210> 13  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying CCAAT sequence

<400> 13  
ccgcgtcgagg caccatccaa tttagaagcgc ggccgcataaa ctat 44

<210> 14  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying CCAAT sequence

<400> 14  
atagtttagc ggccgcgtt ctaatggat ggtgcctcga gcgg 44

<210> 15  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying SRE

<400> 15  
gactatgttaa cctatgggcg gaaatttaac gggatgttaa ctatgc 46

<210> 16  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying SRE

<400> 16  
gactagttaa catcccgta aatttccgcc cctaggtaa ctatgc

46

<210> 17  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying a DNA fragment including CCAAT sequence and SRE

<400> 17  
aaacacgaga ccaccccttag gcatcgacg

30

<210> 18  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying a DNA fragment including CCAAT sequence and SRE

<400> 18  
tttctgcagt gttagttgt ggttagatgg

30

<210> 19  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying a DNA fragment including CCAAT sequence and SRE

&lt;400&gt; 19

cggttcgagg catcgacgc accatcc

27

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: a PCR primer designed for amplifying a DNA fragment including CCAAT sequence and SRE

&lt;400&gt; 20

atagttttagc ggccgcccac tttttttttt gtttttttttgg

40

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: a primer for site-directed mutagenesis

&lt;400&gt; 21

cgctttttttt ccccgccccgc ggccgcagag cttaaagtat gttttttttt

45

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: a primer for site-directed mutagenesis

<400> 22  
gaatgcaatt taaaactttc ctcgagtcgc tggatccc cgccc 45

<210> 23  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:a primer for site-directed mutagenesis

<400> 23  
gtagtaaaac cccggagtc gccccggcca agcccaagtc ttacgc 47

<210> 24  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:a primer for site-directed mutagenesis

<400> 24  
cgtaaggga tgcaagactc gagtagtaaa accccggagt c 41

<210> 25  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:a primer for site-directed mutagenesis

<400> 25  
gcaccatcca attagaagcg cggccgcgaa acagcccaag aaaaagg 47

<210> 26

<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:a primer for site-directed mutagenesis

<400> 26  
taaagtatgt cactagtcga tgcgat 26

<210> 27  
<211> 5640  
<212> DNA  
<213> *Aspergillus nidulans*

tgctcggcgtttacccggag actgtggagt cccaaatcttggcagtc tgaagcggag 840  
tataaaaggc gtcggcaag aagatagagi atccgttaca ccagcttttcttacatgt 900  
ggagtcaaga tgcgtttca gcagctgttccatgggtcg cggcccttgc tggcgttgc 960  
gtcggccaga gccaggccgg cgtcgtatccgttccgttccggcaatgttccgttacgt 1020  
aaggaccctt cgaactgtcac tgggtacaag gtcaccaagc atttggaaagac ccgttccgtt 1080  
ttttatgtcggttccatggcgcttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1140  
aagcttgcgttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1200  
tcgttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1260  
accatgttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1320  
ttttatgtcggttccatggcgcttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1380  
accgttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1440  
ttttatgtcggttccatggcgcttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1500  
accgttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1560  
ttttatgtcggttccatggcgcttccgttccggcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1620  
atctacatcg acaacgagggg cggccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt 1680  
gacttctact tcaatgttccggaccatccccgcaagaatgttggccaggatgttgcgttgcgttgcgtt 1740  
gttccgttccggccctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1800  
taccaggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1860  
cttggagatcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1920  
cccgaaatgttccgttccggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 1980  
cagcatatcaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 2040  
gacgttccgttccgttccggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 2100

gtcgtttggg ccggccccag ttacttccct gactggtttc acccgaacgc tcaggaatac 2160  
tggacggagc agttccctcaa ctcttcgac ggcgtcaacg gcccggacat tgaigccctg 2220  
tggatcgaca tgaatgagcc cgccaaacttt tataaccgcc cciacccagg caacaacacc 2280  
accccgagg agtttgcgaa ggcgaatgac aaccccccgt agccacccggc cgtagggac 2340  
gggccagaatg cccctatccc cgggttcccg gatagtcacc agccaaactt cgcttciggc 2400  
cagacaaacg agaagcgcgc agtttgcacc gtcgaacgc gggctcggtc tcaatcgac 2460  
cgccagctcg ggcgtggccg ctggcggctt gcagtcggcc acigggccgc agacccaaag 2520  
gttggctggc agcacggccg caaatccggc tcggctggc gcccccacga gtgcagaggt 2580  
ctggccaaacc gcgagctcat caggccggccg tatatgtttc agaacggcgc cggccaaacg 2640  
ctggcggaca acactgcgga cacggataatc gtgcaaagcg gcggatacgt ccagtaacgac 2700  
acgcacagcc ttacggcgc gaigaigtcc actcaatcgc acaatgccat gccccctaga 2760  
cgccccaaatg accgcgcatt ggtgatcacc aggagcacat ttggccgc tggaaaggat 2820  
gttcgcact ggcttggagg taaggaattc ctgcaatcta aatttgcggc aagggggaaac 2880  
agctgcgtac tagccctact ttctctgca gataacatctt ccgtatggct ttataccga 2940  
ctgtccatct cccagattct ccagttcgcc tcgctctacc agatccccgt tgcggccct 3000  
gtatgcgtcg gcttcgggg aaacgttaact gagacccctt gtgccaggta cgatcgccct 3060  
aactcgacag catctiacgtt gcttcgciaac atatgtctta ctatgtggc taccctcggt 3120  
tcctctaca ctttcttccg caaccacgccc gagaatcttgc ccaatccccca agatgtttac 3180  
cggtggccga tcgtcgccga agcggccgcg aacggcatgtt ccatttcgata ccagctgggt 3240  
aagtcgtcggtt tcaccatttttgc atcccaacat aatataacattt gatgtccgcata atctatgtcga 3300  
ctacatattac acagccatctt acaaggcagac cccaaacttgcg acaccatccc tttatccgtt 3360  
tttcttcaac tacccttgcg accaaaacac ttacggcatc gatctccagt ttctttatgg 3420

ccccggcatc	cttgcgcgtc	cggcacgga	ggaaaacagc	accagtgttt	cctactaccc	3480
tcccgacgac	atcttcata	tg a t g g g a a c	t g g c a a g c c c	g t c c g c g g a c	a c g g c g a g t a	3540
cg t c t c g c c	g a a g t c g a c g	t c a c c c a t a t	c a c g g t g c a c	t a t a a g g g c g	g t c t c g t c i a	3600
t c c a c a g c g g	a t c g a g a g c g	c g a a c a c c a c	a a c t g c g c t g	c g c c a g a a g g	g a t t c a a t a t	3660
c g i c a t t g c a	c c g g g c t i g g	a t g g c t c i g c	t c a t g g a g a g	c t t t a c c t i g	a c g a t g g c c t	3720
g i c g c a g g t g	c a g g a a a a g	t c t c c g a g a t	t g a c t t i a g c	t a t g i c g a t g	g c g i c t t i g a	3780
g a t g a a g g g c	t c g t t i g a t	a t g a c c c a g g	c g t c g g a a t c	g a g c g g a t t a	c t a t i c i g g g	3840
t g i g g g g c c	a a g c c c g a g g	t g g c g g c i g a	g g a c g c g g a g	g t c g a g t a t g	a t g a g g a g a a	3900
t c a g a a g c t g	g i g c t g c a c g	t c g a t g t a c c	c t i g a c g c g a	a a g t c a a g t a	t c a a g a t t g c	3960
t t g a g t g g g a	g g g a t g g a a t	g a c a g g g a g a	g g c c a t c a a g	t t g c t i g c t g	c c t a c t t a g c	4020
c t a g t c a g g c	t t g g a c g a t t	g c g c a t a c c t	c t g g t t a a g g	c a g a t g t i c c	c t g a t c a g i g	4080
c a g g c a a c c a	t t g c c c c c g	t t c a c t t a c c	a c t t g g a t a t	g c c c a t g g c t	c t a a t a g g a a	4140
t a c t t a a t c c	t a a a t a a t a c	a t t a t t a t g a	c a a t c t c c a	a a a c c i a t t i	c c g g c i g a t g	4200
a t a a c g i g c c	t g g a c t c c g t	g c a g c t g g a a	t t t g a a t a c a	a c a a g g a g c a	c c g i g a a g c t	4260
a t a a a g c c t	a g a g a a a c t a	t a a g a a t g c t	g g c c t i g t t a	c c c t i g t c t c	t g t i c a t a g g	4320
t a c g g a c t a	t g i g c i g c t a	a t a g i c g a c t	t a c t c a i a c t	t g g c g c a g a t	t a t c a t a a t	4380
c a t t g a g t a c	t t a c t c t a t c	g t a a g g t i g c	t g a t g g a g g a	c g g i t g g c a a	t g i g g a c g g a	4440
g c t t a g a g c g	g c a t g g a g a a	a g a g c t a i t t	t a i a c t a g a a	c a t a t a c a a t	t t g a a a g g t	4500
a c a a a a g a g	g a t i a t a c c a	c a t t i g c g c c	t i g c i c a a t a	a t a c t t c a t a	c t a t g t c c t c	4560
g g g c t a c t a a	g g g a g a t t a a	t c a t a a a i c	t g c g a c a g a c	t a t t t c g a g	a g a g i t g a t	4620
t t g i a c t c g a	g a a t g a c a t c	t g c t t a a a a	a a a g a a g g a c	t t t t c i g a c a	g a t t a g i g c c	4680
g g g c t a c t a a	a g g t i c i c g a	g c c a t a t c g a	g i g t a g t t g g	a c g t t t i a c a	a a t c c g t a a t	4740

gacgaaaaca ccgtcagcaa cagggatat ggccgtgtc aatggatttt gacgcaaaat 4800  
gtctacgagg tatcactaai caatatacat ctcaaaatgc ttttgcaccc aatgcgtcg 4860  
ataatcciac cgcttagata tcgttaatac giagccgcgg tagataacaag cgtatattat 4920  
gccigatatac ttaaggctga gaaacctaga aaggacctat tgccaaatgtt aacgcatacag 4980  
agaaaaaacac gcggattcca ccatgtcaga cagaaatgtt atccatgtt tggaaatact 5040  
ggcgctcagg gcactcccgt tgcgtcaagggt acgtcgcatc ccagacggga ttgcgaggaa 5100  
cagcagtctt acaatggagaa tgcataccct tccctcaagt ggccgtacg aatgtccgagt 5160  
acigactcga aataccgcct cagagcaggc taggaaaatg gtgtgtctac ctcaggtaac 5220  
gttccagcaa ggcttccagg aaaccaggca gatctccacg ctgccttcgc cagcgtatac 5280  
ggcgcccgaa cggctttacg ctggggaaa aagcgagcgt atctacggta taccgagcgta 5340  
cgagatcgct cgtcatcatg gcgtaaaaca ctatgtttc gcgtatcg actatactct 5400  
ccgtaaagca ggttggatg agcagtacca tgcgtacat tgcgtatccca aggcggatgt 5460  
gtgtatgtat cctcaaccat ggccaggagg ggttgcacagc tggatcccccg gccaggagtc 5520  
ccgtatgtatt actgtgcgtc tgaccacggg gcccgtacatg gataatgcctt tttgtggat 5580  
gtttgtccca aaggaaaaaga ggttggatca ttgttgggg agaatccggc tggtaagctt 5640

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/13353

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N9/26// (C12N1/15, C12R1:66),  
(C12N9/26, C12R1:66)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12P19/00-19/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Naoki KATO et al., Isomaltose formed by $\alpha$ -glucosidases triggers amylase induction in <i>Aspergillus nidulans</i> ., <i>Curr.Genet.</i> , 13 September, 2002 (13.09.02), (Published online), Vol.42, No.1, pages 43 to 50	1, 2, 4, 5, 7, 8/ 3, 6
Y/A	JP 63-216493 A (Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), 08 September, 1988 (08.09.88), (Family: none)	1, 2, 4, 5, 7, 8/ 3, 6
Y	Masashi KATO et al., No Factors Except for the Hap Complex increase the Taka-amylase A Gene Expression by Binding to the CCAAT Sequence in the Promoter Region., <i>Biosci.Biotechnol.Biochem.</i> , 2001, Vol.65, No.10, pages 2340 to 2342	7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 November, 2003 (13.11.03)	Date of mailing of the international search report 02 December, 2003 (02.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/13353

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shuji TANI et al., In Vivo and in Vitro Analyses of the AmyR Binding Site of the <i>Aspergillus nidulans</i> agdA Promoter; Requirement of the CGG Direct Repeat for Induction and High Affinity Binding of AmyR., <i>Biosci.Biotechnol.Biochem.</i> , 2001, Vol.65, No.7, pages 1568 to 1574	7

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N9/26//  
(C12N1/15, C12R1:66), (C12N9/26, C12R1:66)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12P19/00-19/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	Naoki Kato et al., Isomaltose formed by $\alpha$ -glucosidases triggers amylase induction in <i>Aspergillus nidulans</i> . Curr. Genet., 2002.09.13 (Published online), Vol. 42, No. 1, p. 43-50	1, 2, 4, 5, 7, 8/ 3, 6
Y/A	JP 63-216493 A (日本食品化工株式会社) 1988.09.08 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 7, 8/ 3, 6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4N 3228



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Masashi Kato et al., No Factors Except for the Hap Complex increase the Taka-amylase A Gene Expression by Binding to the CCAAT Sequence in the Promoter Region. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, Vol. 65, No. 10, p. 2340-2342	7
Y	Shuji Tani et al., In Vivo and in Vitro Analyses of the AmyR Binding Site of the Aspergillus nidulans agdA Promoter; Requirement of the CGG Direct Repeat for Induction and High Affinity Binding of AmyR. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, Vol. 65, No. 7, p. 1568-1574	7